

## **BAB IV**

### **METODE PENELITIAN**

#### **4.1 Tempat Penelitian**

Penelitian dilaksanakan di Laboratorium Kimia Terpadu dan Laboratorium Sintesa Farmasi, Fakultas Ilmu Kesehatan, Universitas Muhammadiyah Malang.

#### **4.2 Alat Penelitian**

##### **4.2.1 Uji Fitokimia**

Cawan porselen, Hotplat, Kapiler, Kertas saring Whattman, Corong, Tabung reaksi, Timbangan *analytical balance* (Scout Pro 400g), Kiesel Gel 254, Chamber, Gelas ukur (10 ml ; 25 ml Pyrex), Labu ukur 50 ml Pyrex.

##### **4.2.2 Preparasi Sampel**

Kain Flanel, *Juicer*, Beaker gelas

##### **4.2.3 Pengujian Antioksidan dengan ABTS**

Labu ukur (50,0 ml ; 25,0 ml ; 10,0 ml Pyrex *Iwaki*), Beaker gelas 100 ml Pyrex, Mikropipet 100 $\mu$ l- 1000  $\mu$ l, Pipet tetes, Timbangan *analytical balance* (Scout Pro 400g), Alumunium foil, Batang pengaduk, Spektrofotometer UV-Vis (UVmini-1240 *Shimadzu*), Kuvet *Hellma Analytics*, Pipet volume (0,5 ; 1,0 ; 2,0; 4,0; 5,0ml), Gelas ukur (10 ml; 50 ml;100 ml Pyrex), Piknometer, Tabung reaksi.

#### **4.3 Bahan Penelitian**

##### **4.3.1 Uji Fitokimia**

Buah apel Rome Beauty, Produk olahan sari apel , Aquades teknis, *n* – heksan, Serbuk magnesium, FeCl<sub>3</sub>, Gelatin, NaCl 10%, HCl pekat, Butanol, Kloroform, Aseton, Asam formiat, Asam sulfat 10%, Etanol teknis, Etil asetat.

##### **4.3.2 Pengujian Antioksidan dengan ABTS**

Aquades teknis, Etanol teknis, ABTS(2,2-Azinobis(3- etilbenzotiazolin)-6-asam sulfonat) *Tokyo Chemical Industry*, Vitami C, Olahan Sari Apel, Buah apel Rome Beauty, Kalium persulfat (K<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>8</sub>), Aquades *Pro Injection*.

#### **4.4 Rancangan Penelitian**

##### **4.4.1 Design Penelitian**

Penelitian ini adalah penelitian eksperimental yang bertujuan untuk mengetahui perbedaan aktivitas antioksidan buah apel segar Rome Beauty dan produk olahan sari apel dengan metode ABTS. Tahapan kegiatan yang akan dilakukan meliputi preparasi sampel, penapisan fitokimia dan pengujian aktivitas antioksidan.

##### **4.4.2 Variabel Penelitian**

###### **4.4.2.1 Variabel Bebas**

Variabel bebas pada penelitian ini adalah buah apel segar Rome Beauty dan produk olahan sari apel. Konsentrasi larutan uji yang digunakan pada buah apel segar Rome Beauty yaitu sebesar 52 ppm, 520 ppm, 5.200 ppm, 13.000 ppm, 15.600 ppm, 20.800 ppm, 26.000 ppm, 52.000 ppm dan konsentrasi yang digunakan pada produk olahan sari apel yaitu sebesar 52.000 ppm, 104.000 ppm, 208.000 ppm, 416.000 ppm, 832.000 ppm, 1.040.000 ppm.

###### **4.4.2.2 Variabel Tergantung**

Sebagai variabel tergantung pada penelitian ini adalah absorbansi dari larutan uji buah apel segar Rome Beauty dan produk olahan sari apel dengan larutan kontrol positif.

#### **4.5 Prosedur Kerja**

##### **4.5.1 Preparasi Sampel**

Sampel yang digunakan pada penelitian ini yaitu produk olahan sari apel dan buah apel segar Rome Beauty. Larutan buah apel segar Rome Beauty dibuat dengan 1 Buah apel segar Rome Beauty di *juicer* lalu disaring dengan kain flanel.

##### **4.5.2 Penapisan Fitokimia Buah Apel Rome Beauty, Produk Olahan Sari Apel dan Ekstrak Daun Jambu Biji (Kontrol Positif)**

###### **4.5.2.1 Identifikasi Senyawa Golongan Polifenol dan Tanin**

###### **1. Preparasi Sampel**

Sebanyak 5 ml produk olahan sari apel dan larutan apel segar Rome Beauty dimasukkan ke dalam tabung reaksi yang berbeda, dan ditimbang 0,3 gram

ekstrak daun jambu biji, kemudian dari masing-masing sampel ditambahkan 10 ml aquades panas, diaduk dan dibiarkan sampai temperatur kamar, lalu tambahkan 3-4 tetes 10% NaCl. Filtrat dari masing masing sampel dibagi menjadi tiga bagian dan disebut sebagai larutan A, B, C.

## 2. Uji gelatin

Larutan A digunakan sebagai blanko, larutan B ditambah dengan sedikit larutan gelatin dan 5 ml larutan NaCl 10%. Jika terjadi endapan putih menunjukkan adanya tanin.

## 2 Uji Ferri Klorida

Larutan C diberi beberapa larutan  $\text{FeCl}_3$ , diamati perubahan warna. Jika penambahan gelatin dan NaCl tidak timbul endapan putih tetapi setelah ditambahkan dengan larutan  $\text{FeCl}_3$  terjadi perubahan warna menjadi hijau biru hingga hitam, menunjukkan adanya senyawa polifenol (Marliana *et al.*, 2005).

## 3 Kromatografi Lapis Tipis

Larutan A digunakan untuk identifikasi dengan KLT. Fase diam yang digunakan yaitu kiesel gel 254, fase gerak yaitu Klorofom-etil asetat- asam formiat (1 ml:18 ml:1 ml) dibuat eluen 20 ml dan penampak noda yang digunakan yaitu pereaksi  $\text{FeCl}_3$ . Jika timbul warna hitam menunjukkan adanya polifenol dalam sampel.

### 4.5.2.2 Identifikasi Senyawa Golongan Flavonoid

#### 1. Preparasi Sampel

Sebanyak 5 ml produk olahan sari apel dan larutan apel segar Rome Beauty dimasukkan ke dalam tabung reaksi yang berbeda, dan ditimbang 0,3 g ekstrak daun jambu biji, kemudian masing-masing sampel ditambahkan 3 ml *n*-heksan sampai *n*-heksan tidak berwarna. Residu masing-masing sampel dilarutkan dalam 20 ml etanol dan dibagi menjadi 3 bagian, disebut larutan A, B, C.

#### 2. Reaksi Warna

##### a. HCl

Larutan A digunakan sebagai blanko, Larutan B ditambah 0,5 ml HCl pekat, kemudian dipanaskan di atas penangas air dan di amati perubahan warna yang terjadi. Bila perlahan-lahan menjadi warna merah terang atau ungu menunjukkan adanya senyawa leukoantosianin (dibandingkan dengan blanko)

b. Uji Wilsater

Larutan A sebagai blanko, larutan C ditambahkan 0,5 ml HCl pekat dan serbuk magnesium. Kemudian diamati perubahan warna yang terjadi, diencerkan dengan 2 ml aquades dan ditambahkan 1 ml butanol. Perubahan warna jingga menunjukkan adanya flavon, merah pucat menunjukkan adanya flavonol, dan merah tua menunjukkan adanya flavanon (Marliana *et al.*, 2005).

c. Kromatografi Lapis Tipis

Larutan A ditotolkan pada fase diam. Fase diam yang digunakan yaitu kiesel gel 254, fase gerak yang digunakan yaitu kloroform-aseton-asam formiat (7ml: 7ml: 2 tetes) dengan penampak noda asam sulfat 10%. Adanya flavonoid ditunjukkan dengan timbulnya noda berwarna kuning intensif.

### 4.5.3 Persiapan Pembuatan Larutan Uji Aktivitas Antioksidan

#### 4.5.3.1 Pembuatan Larutan Pereaksi ABTS

Membuat larutan ABTS 7mM dengan menimbang 80 mg ABTS dilarutkan dalam 10,0 ml aquades. Membuat larutan kalium persulfat 2,45mM dengan menimbang 13,2 mg kalium persulfat dilarutkan dalam 10,0 ml air. Kemudian (1:1) larutan dicampur dalam ruang gelap selama 12- 16 jam. Larutan ABTS dilarutkan dengan aquades dan etanol (1:1) (Wangcharoen and Morasuk, 2008)

#### 4.5.3.2 Pembuatan Larutan Blanko

Larutan blanko yang digunakan adalah aquades dan etanol dengan perbandingan 1:1 dan ditambahkan 100 µlaquades untuk penentuan  $\lambda$  maksimum.

#### 4.5.3.3 Pembuatan Larutan Sari Apel Sebagai Larutan Uji

Larutan sari apel memiliki berat jenis 1,04 g/cm<sup>3</sup> dimana konversi ppm terdapat pada **Lampiran 3**. Pembuatan larutan baku induk sari apel dibuat dengan 100% sari apel dengan konsentrasi 1.040.000 ppm ,yaitu dengan memipet langsung sari apel sebagai (BK6). Sari apel di uji dalam beberapa seri konsentrasi yaitu 52.000 ppm, 104.000 ppm, 208.000 ppm, 416.000 ppm, 832.000 ppm. Larutan uji dilakukan pengukuran sebanyak tiga kali replikasi

Pembuatan larutan uji :

BK5: Dibuat konsentrasi 832.000 ppm dengan dipipet 20,0 ml BK 6 masukkan ke dalam labu ukur 25,0 ml, kemudian ditambah aquades hingga 25,0 ml. Dari larutan tersebut dipipet 100  $\mu$ l kemudian dimasukkan ke dalam tabung reaksi dan ditambahkan 6,0 ml larutan peraksi ABTS.

BK4 : Dibuat konsentrasi 416.000 ppm dengan dipipet 5,0 ml BK 7 masukkan ke dalam labu ukur 10,0 ml, kemudian ditambah aquades hingga 10,0ml. Dari larutan tersebut dipipet 100  $\mu$ l kemudian dimasukkan ke dalam tabung reaksi dan ditambahkan 6,0 ml larutan peraksi ABTS.

BK 3 : Dibuat konsentrasi 208.000 ppm dengan dipipet 5,0 ml BK 6 masukkan ke dalam labu ukur 10,0 ml, kemudian ditambah aquades hingga 10,0 ml. Dari larutan tersebut dipipet 100  $\mu$ l kemudian dimasukkan ke dalam tabung reaksi dan ditambahkan 6,0 ml larutan peraksi ABTS.

BK 2: Dibuat konsentrasi 104.000 ppm dengan dipipet 5,0 ml BK 6 masukkan ke dalam labu ukur 10,0 ml, kemudian ditambah aquades hingga 10,0 ml. Dari larutan tersebut dipipet 100  $\mu$ l kemudian dimasukkan ke dalam tabung reaksi dan ditambahkan 6,0 ml larutan peraksi ABTS.

BK 1: Dibuat konsentrasi 52.000 ppm dengan dipipet 5,0 ml BK 5 masukkan labu ukur 10,0 ml, kemudian ditambah aquades hingga 10,0 ml. Dari larutan tersebut dipipet 100  $\mu$ l kemudian dimasukkan ke dalam tabung reaksi dan ditambahkan 6,0 ml larutan peraksi ABTS.

#### 4.5.3.4 Pembuatan Larutan Buah Apel Rome Beauty Sebagai Larutan Uji

Larutan apel segar Rome Beauty memiliki berat jenis 1,04 g/cm<sup>3</sup> dimana konversi ppm terdapat pada **Lampiran 3**. Pembuatan larutan baku induk apel segar Rome Beauty dengan konsentrasi 104.000 ppm ,yaitu dengan memipet 1,0 ml larutan apel segar Rome Beauty kemudian ditambahkan aquades hingga 10,0 ml pada labu ukur dan dikocok hingga homogen sebagai LBI. Larutan apel segar Rome Beauty di uji dalam beberapa seri konsentrasi yaitu 104 ppm, 520 ppm, 5.200 ppm, 13.000 ppm, 15.600 ppm, 20.800 ppm, 26.000 ppm, 52.000 ppm. dimana pada larutan uji ini dilakukan pengukuran sebanyak tiga kali replikasi

Pembuatan larutan uji :

- BK8: Dibuat konsentrasi 52.000 ppm dengan dipipet 5,0 ml LBI masukkan ke dalam labu ukur 10,0 ml, kemudian ditambah aquades hingga 10,0 ml. Dari larutan tersebut dipipet 100  $\mu$ l kemudian dimasukkan ke dalam tabung reaksi dan ditambahkan 6,0 ml larutan peraksi ABTS.
- BK7 : Dibuat konsentrasi 26.000 ppm dengan dipipet 5,0 ml BK 8 masukkan ke dalam labu ukur 10,0 ml, kemudian ditambah aquades hingga 10,0 ml. Dari larutan tersebut dipipet 100  $\mu$ l kemudian dimasukkan ke dalam tabung reaksi dan ditambahkan 6,0 ml larutan peraksi ABTS.
- BK 6 : Dibuat konsentrasi 20.800 ppm dengan dipipet 2,0 ml LBI masukkan ke dalam labu ukur 10,0 ml, kemudian ditambah aquades hingga 10,0 ml. Dari larutan tersebut dipipet 100  $\mu$ l kemudian dimasukkan ke dalam tabung reaksi dan ditambahkan 6,0 ml larutan peraksi ABTS.
- BK5: Dibuat konsentrasi 15.600 ppm dengan dipipet 5,0 ml BK 8 masukkan ke dalam labu ukur 10,0 ml, kemudian ditambah aquades hingga 10,0 ml. Dari larutan tersebut dipipet 100  $\mu$ l kemudian dimasukkan ke dalam tabung reaksi dan ditambahkan 6,0 ml larutan peraksi ABTS.
- BK 4: Dibuat konsentrasi 13.000 ppm dengan dipipet 5,0 ml BK 7 masukkan ke dalam labu ukur 10,0 ml, kemudian ditambah aquades hingga 10,0 ml. Dari larutan tersebut dipipet 100  $\mu$ l kemudian dimasukkan ke dalam tabung reaksi dan ditambahkan 6,0 ml larutan peraksi ABTS.
- BK 3 : Dibuat konsentrasi 5.200 ppm dengan dipipet 1,0 ml BK 8 masukkan ke dalam labu ukur 10,0 ml, kemudian ditambah aquades hingga 10,0 ml. Dari larutan tersebut dipipet 100  $\mu$ l kemudian dimasukkan ke dalam tabung reaksi dan ditambahkan 6,0 ml larutan peraksi ABTS.
- BK 2 : Dibuat konsentrasi 520 ppm dengan dipipet 1,0 ml BK 3 masukkan ke dalam labu ukur 10,0 ml, kemudian ditambah aquades hingga 10,0 ml. Dari larutan tersebut dipipet 100  $\mu$ l kemudian dimasukkan ke dalam tabung reaksi dan ditambahkan 6,0 ml larutan peraksi ABTS.
- BK 1 : Dibuat konsentrasi 104 ppm dengan dipipet 2,0 ml BK 2 masukkan ke dalam labu ukur 10,0 ml, kemudian ditambah aquades hingga 10,0 ml. Dari larutan tersebut dipipet 100  $\mu$ l kemudian dimasukkan ke dalam tabung reaksi dan ditambahkan 6,0 ml larutan peraksi ABTS.

#### 4.5.3.5 Pembuatan Larutan Vitamin C Sebagai Kontrol Positif

Pada penelitian ini menggunakan vitamin C sebagai kontrol positif. Pembuatan larutan baku induk vitamin C dengan konsentrasi 1.000 ppm yaitu ditimbang 50 mg vitamin C dan dilarutkan dengan aquades sampai 50,0 ml pada labu ukur dan dikocok hingga larut sebagai LBI 1. Dibuat 300 ppm dengan memipet 3,0 ml LBI 1 kemudian ditambahkan aquades hingga 10 ml dan dikocok hingga homogen sebagai LBI 2. Konsentrasi vitamin C yang digunakan yaitu 0,3 ppm, 3 ppm, 15 ppm, 30 ppm, 60 ppm, 90 ppm, 120 ppm, dimana pada larutan uji ini dilakukan pengukuran sebanyak tiga kali replikasi

Pembuatan larutan uji :

BK 7 : Dibuat konsentrasi 120 ppm dengan dipipet 4,0 ml LBI 2 masukkan dalam labu ukur 10,0 ml, kemudian ditambah aquades hingga 10,0 ml. Dari larutan tersebut dipipet 100  $\mu$ l dan ditambahkan 6,0 ml larutan peraksi ABTS.

BK 6 : Dibuat konsentrasi 90 ppm dengan dipipet 3,0 ml LBI 2 masukkan kedalam labu ukur 10,0 ml, kemudian ditambah aquades hingga 10,0 ml. Dari larutan tersebut dipipet 100  $\mu$ l kemudian dimasukkan dalam tabung reaksi dan ditambahkan 6,0 ml larutan peraksi ABTS.

BK 5 : Dibuat konsentrasi 60 ppm dengan dipipet 5,0 ml BK 7 masukkan ke dalam labu ukur 10,0 ml, kemudian ditambah aquades hingga 10,0 ml. Dari larutan tersebut dipipet 100  $\mu$ l kemudian dimasukkan ke dalam tabung reaksi dan ditambahkan 6,0 ml larutan peraksi ABTS.

BK 4 : Dibuat konsentrasi 30 ppm dengan dipipet 1,0 ml LBI 2 masukkan ke dalam labu ukur 10,0 ml, kemudian ditambah aquades hingga 10,0 ml. Dari larutan tersebut dipipet 100  $\mu$ l kemudian dimasukkan ke dalam tabung reaksi dan ditambahkan 6,0 ml larutan peraksi ABTS.

BK 3: Dibuat konsentrasi 15 ppm dengan dipipet 5,0 ml BK 4 masukkan ke dalam labu ukur 10,0 ml, kemudian ditambah aquades hingga 10,0 ml. Dari larutan tersebut dipipet 100  $\mu$ l kemudian dimasukkan ke dalam tabung reaksi dan ditambahkan 6,0 ml larutan peraksi ABTS.

BK 2 : Dibuat konsentrasi 3 ppm dengan dipipet 1,0 ml BK 4 masukkan ke dalam labu ukur 10,0 ml, kemudian ditambah aquades hingga 10,0 ml.

Dari larutan tersebut dipipet 100  $\mu$ l kemudian dimasukkan ke dalam tabung reaksi dan ditambahkan 6,0 ml larutan peraksi ABTS.

BK 1 : Dibuat konsentrasi 0,3 ppm dengan dipipet 1,0 ml BK 2 masukkan ke dalam labu ukur 10,0 ml, kemudian ditambah aquades hingga 10,0 ml. Dari larutan tersebut dipipet 100  $\mu$ l kemudian dimasukkan ke dalam tabung reaksi dan ditambahkan 6,0 ml larutan peraksi ABTS.

#### **4.5.4 Pengukuran Aktivitas Antioksidan dengan Spektrofotometri UV-Vis**

##### **4.5.4.1 Pengukuran $\lambda$ Maksimum Larutan ABTS**

Pada pengukuran  $\lambda$ maks di ukur larutan ABTS dengan menggunakan blanko,  $\lambda$ maks yang di dapatkan sebagai pengukuran absorbansi larutan uji.

##### **4.5.4.2 Waktu Inkubasi**

Waktu inkubasi ditentukan dengan *operating time* yang merupakan waktu yang dibutuhkan suatu senyawa untuk bereaksi dengan senyawa lain hingga terbentuk senyawa yang stabil. Sehingga untuk pengamatannya dilakukan pengukuran serapan pada menit ke 2 sampai menit ke 65.

##### **4.5.4.3 Pengukuran Absorbansi Larutan Uji dan Kontrol Positif**

Larutan uji sari apel, larutan uji apel segar Rome Beauty dan Vitamin C sebagai (kontrol positif) dengan berbagai seri konsentrasi di ukur nilai absorbansinya menggunakan Spektrofotometer UV-Vis dengan  $\lambda$  maks yang telah ditentukan.

#### **4.6 Analisis Data**

Data yang diperoleh akan dianalisis secara deskriptif. Analisa secara deskriptif akan diketahui nilai penghambatan ( $IC_{50}$ ) dari larutan uji sari apel dan apel segar Rome Beauty serta vitamin C (kontrol positif)



#### 4.6.1 Perhitungan Persen Penghambatan

Persen penghambatan diperoleh dari data pengukuran absorpsi sampel yaitu seri konsentrasi larutan uji dan vitamin C sebagai kontrol positif dengan absorbansi larutan blanko dengan rumus sebagai berikut

$$\text{Persen penghambatan} = \frac{(\text{Abs larutan pereaksi ABTS} - \text{Abs larutan uji})}{(\text{Abs larutan pereaksi ABTS})} \times 100\%$$

#### 4.6.2 Perhitungan IC<sub>50</sub>

Aktivitas antioksidan dinyatakan dengan IC<sub>50</sub> yaitu konsentrasi sampel yang dapat merendam sebanyak radikal bebas ABTS. Nilai IC<sub>50</sub> merupakan konsentrasi yang diperoleh dari perhitungan pada saat nilai persen penghambatan sebesar 50 dari persamaan regresi linier  $y = bx + a$ . Nilai dari x pada persamaan tersebut menunjukkan konsentrasi yang akan dicari atau yang diperlukan untuk merendam 50% radikal bebas ABTS, sedangkan nilai y pada persamaan ini adalah persen penghambatan. Dari persamaan tersebut dapat dibandingkan nilai IC<sub>50</sub> pada produk olahan sari apel dengan apel segar Rome Beauty dan vitamin C sebagai kontrol positif sehingga dapat diketahui perbedaan aktivitas antioksidan pada produk olahan sari apel dan apel segar Rome Beauty.